ISBN: 978-607-00-2083-4

LA ELIMINACIÓN DE LA SEROTONINA DEL HIPOCAMPO FACILITA EL APRENDIZAJE E INCREMENTA LA POTENCIA DE LA ACTIVIDAD THETA DE ALTA FRECUENCIA DEL GIRO DENTADO, EN LA RATA.

Blanca Erika Gutiérrez Guzmán[1,3]. Rafael Medina Navarro[2]. Miguel Angel Guevara Pérez[3]. María Esther Olvera Cortés[1].

[1]Laboratorio de Neurofisiología Experimental, [2] Laboratorio de Metabolismo Celular, Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, IMSS (maesolco@yahoo.com). [3]Laboratorio de Correlación Electroencefalográfica y Conducta. Instituto de Neurociencias, CUCBA, Universidad de Guadalajara. Francisco de Quevedo #180 Arcos Vallarta, CP 44130. Guadalajara, Jalisco, México.

Correo-e: *gugube7@yahoo.com.mx*

Introducción

Entre las estrategias que los individuos utilizan para orientarse en el espacio y navegar en él, se encuentra el aprendizaje de lugar, que consiste en localizar un lugar con respecto a la configuración de señales disponibles en el entorno circundante (Okeefe & Nadel 1978). Este aprendizaje es dependiente del hipocampo, pues estudios clínicos y experimentales indican que las lesiones del hipocampo o de las estructuras asociadas, (fimbria fórnix, séptum, corteza entorrinal, y complejo subicular), provocan deficiencias graves y permanentes en el aprendizaje de lugar tanto en ratas como en humanos (Sutherland & Rodríguez 1989).

En adición a lo anterior, estudios electrofisiológicos y de EEG han mostrado que en el hipocampo se origina y predomina la actividad theta, un patrón sinusoidal de actividad rítmica lenta que oscila entre 4 y 12 Hz, ocurre predominantemente durante la ejecución de movimientos voluntarios (Vanderwolf 1988) y ha sido relacionada con el procesamiento de información para la memoria espacial (Olvera-Cortes et al 2002, 2004).

Se ha propuesto que la actividad theta hipocampal está controlada por un sistema de conexiones que se originan en el tallo cerebral, con relevos en el diencéfalo, de ahí continúa al área septal y al hipocampo, conformando las vías multisinápticas de sincronización ascendente de la actividad theta (Vertes et al 2004).

Por otro lado, se sabe que existe una densa inervación serotoninérgica originada en el núcleo del rafe medial (RM) hacia el hipocampo así como una gran densidad de receptores, particularmente en la región del giro dentado. Los principales aferentes serotoninérgicos que arriban al hipocampo lo hacen a través de la fimbria - fórnix y el haz del cíngulo (Azmitia & Segal 1978).

En diversos experimentos, se ha observado que cuando se estimula al rafe mesencefálico se desorganizan las ráfagas de la actividad theta y paralelamente disminuye su frecuencia (Vertes 1986); además, la estimulación eléctrica de RM o bien la administración de serotonina (5-HT) inhiben el disparo de las células piramidales hipocampales (Segal 1975) y desincronizan el EEG hipocampal (Kitchigina et al 1999). En otros estudios, la lesión específica de RM da lugar a la presencia de actividad theta

hipocampal continua y persistente (Yamamoto et al 1979). Por otro lado la aplicación de agonistas del receptor $5HT1_A$ en el RM genera trenes largos y continuos de actividad theta en ratas anestesiadas (Vertes et al 1994), mientras que la disminución de 5HT hipocampal incrementa el tamaño de la población de espigas en GD (Richter-Levin et al 1994). A partir de ello se ha propuesto que células serotoninégicas desincronizan o tienen un efecto supresor sobre la actividad theta hipocampal (McKena & Vertes 2001).

Sin embrago, estudios recientes han mostrado que la disminución de aproximadamente el 50% de la 5-HT hipocampal no da lugar a modificaciones de la frecuencia theta y cuando se incrementa la actividad serotoninérgica ocurre una disminución de actividad theta de alta frecuencia (6.5-9.5Hz) y concurrente a esto último ocurren deficiencias en el aprendizaje de lugar (Gutiérrez-Guzmán et al 2007).

Con respecto a la participación de la serotonina en el aprendizaje y memoria dependientes del hipocampo, se ha observado que cuando se interfiere con el sistema serotoninérgico, no se afecta el desempeño en el aprendizaje y memoria espacial, evaluado en el laberinto acuático de Morris y de Olton (Altman et al 1989, Asin et al 1985). Sin embargo, en las evidencias anteriores, el abatimiento de la serotonina hipocampal solamente ha sido parcial y no fue evaluada la actividad theta, por lo que no ha sido posible definir cabalmente el papel que este neurotransmisor juega en la modulación de ésta actividad durante la realización de procesos de aprendizaje y memoria de lugar.

Objetivo

Por lo anterior, este estudio se realizó con el fin de determinar el efecto de la eliminación de serotonina hipocampal sobre el aprendizaje espacial y sobre la actividad theta del giro dentado concurrente al aprendizaje, en la rata.

Materiales y métodos

Se utilizaron 18 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 350 a 450 g de peso, mantenidas en un bioterio bajo condiciones estándar, con un ciclo de luz oscuridad de 12 por 12 horas (7-19 hrs.) con suministro de alimento y agua *ad libitum*, las cuales fueron asignadas al azar a un grupo experimental (n=9) o a un grupo control (n=9).

Grupo experimental. Mediante la aplicación bilateral del neurotóxico 5,7-Dihidróxitriptamina (5,7-DHT), se lesionaron los aferentes serotoninérgicos hipocampales (haz del cíngulo y fimbria fornix) y se les implantó un electrodo bipolar de registro en el giro dentado del hipocampo dorsal derecho, de acuerdo con las coordenadas esterotáxicas de Paxinos (Paxinos & Watson 1998).

Grupo control se sometieron al mismo procedimiento quirúrgico pero sólo se les aplicó solución vehículo en las mismas coordenadas y volumen que al grupo experimental, además de colocarles el electrodo bipolar de registro en el hipocampo dorsal.

Luego de 21 días de recuperación se procedió a realizar las evaluaciones conductuales. Se utilizo el laberinto acuático de Morris, que consiste en una tina circular con agua en la cual hay una plataforma no visible en una posición fija, además se colocaron señales espaciales en el cuarto de registro, alrededor del laberinto.

La prueba consistió en 4 ensayos diarios con intervalo inter-ensayo de 2 minutos, durante 6 días consecutivos (si durante el transcurso de cada ensayo, la rata no

encontraba la plataforma en 60 segundos, se le colocaba sobre la plataforma por un periodo de 15 segundos). En el día 7 se colocó al animal en la tina sin la plataforma y se le permitió que la buscara durante 30 segundos (ensayo de prueba).

Las rutas de nado fueron video-grabadas para su posterior análisis. Las variables a considerar fueron: latencia de escape, distancia recorrida, velocidad de nado y número de cruces por el área del cuadrante en el ensayo prueba.

El registro de la actividad eléctrica hipocampal tuvo lugar durante diferentes etapas de la realización de las pruebas conductuales: "condición basal" con la rata mojada en estado "*Atento quieto*" durante 15 segundos en su caja de reposo; en la etapa de "*búsqueda"* que comprendió desde la colocación de la rata en el agua frente a la tina hasta cuando el animal subió a la plataforma de escape, y la etapa llamada "*meta"* correspondiente al registro EEG durante 15 segundos mientras la rata permaneció sobre la plataforma.

Los filtros de baja y alta frecuencia fueron colocados a 1 y 100 Hz respectivamente y los registros fueron capturados a una frecuencia de muestreo de 256 Hz. Se analizaron valores de potencia de segmentos de 2 segundos, obtenidos mediante la aplicación de la transformada rápida de Fourier (FFT), a través del programa EEGmagic (Guevara MA & Hernández-González 2006). Se realizó un análisis preliminar mediante la técnica de componentes principales que derivó en la división de la actividad theta en las siguientes 3 sub-bandas: banda 1 (4-5 Hz), banda 2 (6-7 Hz) y banda 3 (8-10 Hz).

Se verificó histológicamente la posición de los electrodos. Para verificar el contenido de serotonina (5HT) y de Acido 5-Hidroxi-indol-ascético (5HIIA), se utilizó el tejido del hipocampo dorsal izquierdo de cada rata, y se midió la concentración mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Resultados

Neuroquímica. La determinación de la concentración de serotonina a través de HPLC, mostró que el grupo experimental tuvo una reducción significativa de la concentración de serotonina (98-100 % con respecto al grupo control) acompañado de la disminución de la concentración de ácido 5-Hidroxi-indol-ascético (5HIAA), con respecto al grupo control (figura 1).

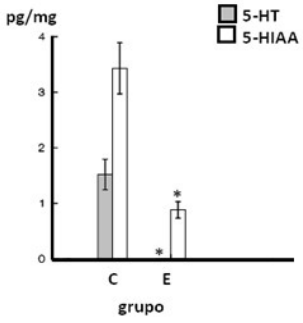

Figura 1. Media ± ES de la concentración de serotonina (5HT) y Acido 5-Hidroxi-indol-ascético (5HIAA) en pg/mg en el grupo control (C) y experimental (E). * $p \leq 0.05$ significativamente menor respecto a control.

Evaluación conductual**.** En el análisis intragrupal de la distancia recorrida por día de los animales con respecto al primer día de entrenamiento, se observo que el grupo control, mostró una reducción significativa hasta el día 6, mientras que el grupo experimental presentó una drástica disminución de la distancia recorrida los días 3, 4, 5, y 6 con respecto al primer día de entrenamiento (figura2).

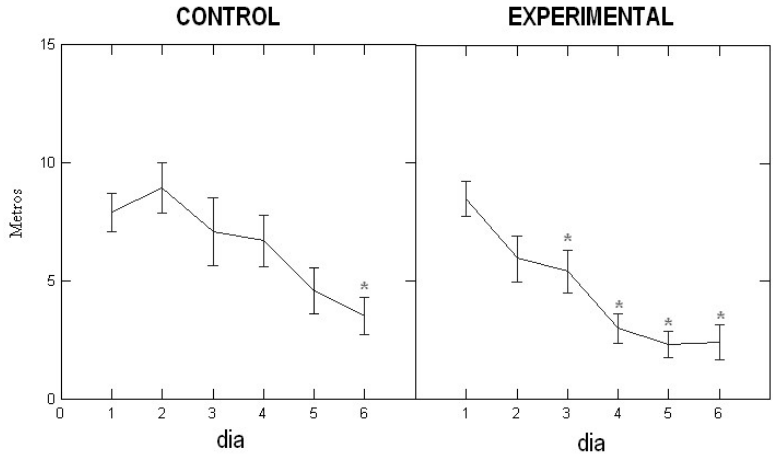

Figura 2. Media ± error estándar de la distancia recorrida por día de los animales pertenecientes a cada grupo. * p≤0.05, día 1 vs siguientes.

Registro del EEG hipocampal**.** Se observo que en los animales del grupo control y experimental la actividad theta fue mayor durante la etapa de búsqueda con respecto a las otras etapas (figura 3).

En el análisis intragrupal, al realizar la comparación por cada etapa en los diferentes días de entrenamiento por banda, se observo que en la etapa de búsqueda el grupo control presentó una mayor potencia relativa de la banda 3 (8-10 Hz) solamente en el día tres con respecto al día primero, mientras que en el grupo experimental ocurrió un aumento significativo en la potencia relativa de la misma banda los días 2, 3, 4, 5 y 6, con respecto al primer día de entrenamiento (figura 4A).

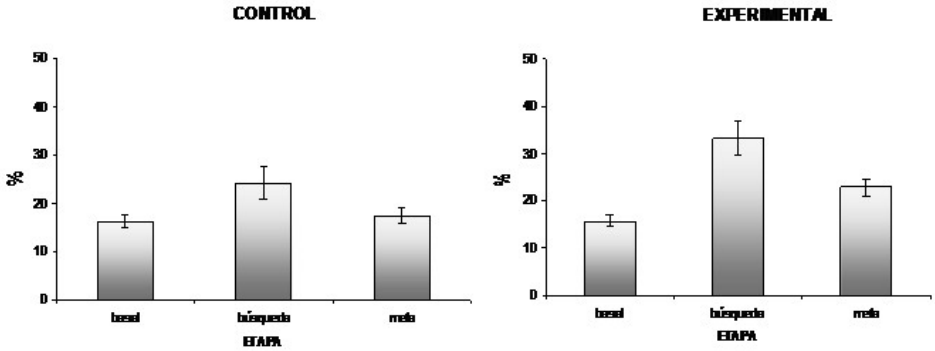

Figura 3. Media ± error estándar de potencia relativa de la banda total de theta en cada etapa (basal, búsqueda y meta) durante los 6 días de entrenamiento, en el grupo control y experimental.

Durante la etapa meta, en el grupo control no se observaron cambios significativos en la potencia relativa con respecto al primer día, a diferencia en el grupo experimental en el que hubo aumento significativo los días 3, 4, 5, y 6 con respecto al primer día de entrenamiento (figura 4B.)

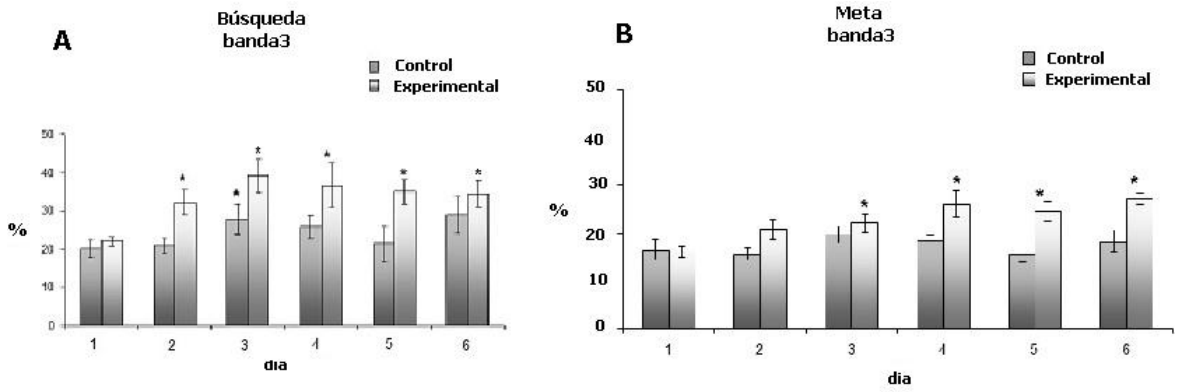

Figura 4. Media ± error estándar de la potencia relativa de la banda de 8-10 Hz por día de entrenamiento, durante las etapas de búsqueda y meta en los sujetos de ambos grupos. En cada grupo, * p≤0.05, día 1 vs siguientes.

En las bandas 1 y 2 no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las tres etapas. La etapa basal tampoco mostró diferencias en ninguna banda (datos no mostrados).

En lo que respecta al análisis intergrupal, se observó una mayor actividad theta de la banda 3 (8-10 Hz) o de alta frecuencia durante las etapas de búsqueda y meta en el grupo experimental respecto al grupo control (Figura 5).

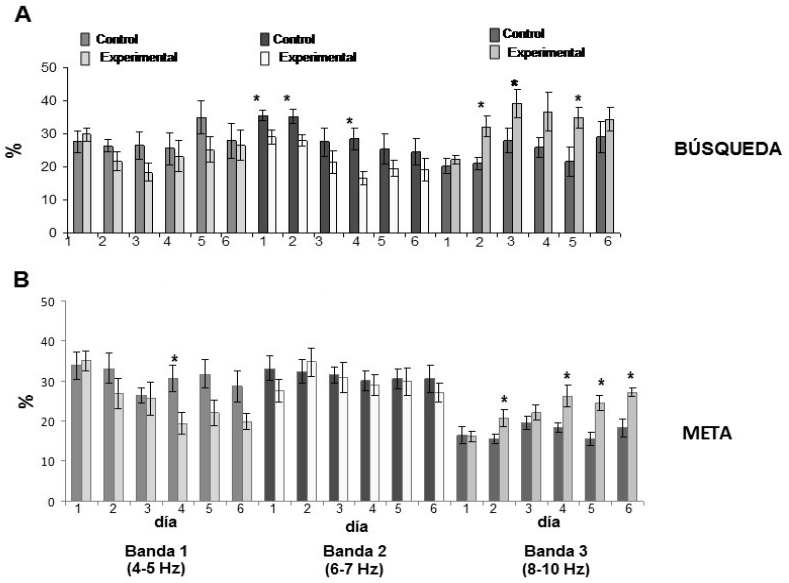

Figura 5. Comparación intergrupal. Media ± error estándar de la potencia relativa de la banda 1 (4-5 Hz), banda 2 (6-7 Hz) y banda 3 (8-10 Hz) por día, de los animales entrenados en los dos grupos durante la etapa de búsqueda y meta. * p≤0.05, grupo experimental vs grupo control.

Discusión

Se ha sugerido que la serotonina tiene influencia sobre estructuras relacionadas con el aprendizaje y la memoria, por ejemplo, la disminución de serotonina genera una reducción significativa en el número de errores en una prueba de memoria de corto plazo, de manera que se muestra una mayor eficiencia en el aprendizaje (González-Burgos et al 1998). Además la administración del agonista del receptor 5-HT2A/2C o 5-HT4 o bien la administración de antagonistas de los receptores 5-HT1A, 5-HT3 y 5-HT1B previenen el deterioro de la memoria y facilitan el aprendizaje (Buhot et al 2000).

Al aumentar la velocidad de utilización de serotonina sobre el hipocampo se observaron deficiencias en el laberinto acuático de Morris mientras que su disminución parcial no tuvo efecto (Gutiérrez-Guzmán et al 2007), sin embargo, el eliminarla casi completamente del hipocampo, generó una mayor eficiencia en la resolución del laberinto acuático de Morris (Gutiérrez-Guzmán 2007). En el presente trabajo se observó una facilitación en el aprendizaje asociada con una mayor expresión de actividad theta de alta frecuencia, de manera que la serotonina podría estar actuando para establecer diferencias en la eficiencia del aprendizaje, pues se conoce que tiene un efecto inhibitorio sobre células colinérgicas, gabaérgicas y glutamatérgicas del sistema septo-hipocampal (Miettinen 1992), esenciales para la formación de la memoria.

Se ha observado que ocurre un aumento de actividad theta en la banda de alta frecuencia (6.5-9.5 Hz) en CA1 durante el transcurso de los días de entrenamiento en el laberinto acuático de Morris, y se ha propuesto que es reflejo del procesamiento de información del hipocampo durante las etapas de búsqueda y meta (Olvera-Cortés et al 2002). Dicha región hipocampal ha sido involucrada en la estabilización y consolidación de la memoria (Pissadaki & Poirazi 2007). De acuerdo a la teoría de la participación de la serotonina como desincronizador del EEG hipocampal basada en observaciones de que el aumento cerebral de serotonina por la aplicación de inhibidores de su recaptura, ejerce un control inhibitorio de la actividad del ritmo theta (Kudina et al 2004), y en base a los estudios que evalúan simultáneamente la conducta y el EEG; cuando la serotonina se incrementa, se ve disminuida la potencia relativa de la actividad theta de alta frecuencia, mientras que la eliminación parcial no genera cambios en dicha actividad (Gutiérrez-Guzmán et al 2007), sin embargo la eliminación casi total de serotonina no generó cambios en la potencia de la actividad theta de CA1 en ninguna de las bandas estudiadas (Gutiérrez-Guzmán 2007), no obstante las bandas consideradas no fueron las mismas de este trabajo. En este estudio, se puede observar en el grupo experimental que durante las etapas de procesamiento de información, ocurre un aumento en la potencia de la banda 3 (8 a 10 Hz) de alta frecuencia, mientras que en el grupo control no se observa dicho efecto. En base a evidencias de que el GD participa en el procesamiento de información durante los primeros días del entrenamiento, es probable que la ausencia de serotonina en el hipocampo esté ejerciendo una desinhibición en las células granulares del GD y así estaría potenciando la expresión de actividad theta hipocampal. De esta manera podría facilitar la consolidación del aprendizaje espacial, ya que se sabe que la serotonina puede producir tanto inhibición directa como indirecta de la actividad de las células del hipocampo.

Conclusión

La eliminación selectiva de la serotonina hipocampal en la rata, facilitó el aprendizaje en el laberinto acuático de Morris aunado a un aumento en la banda de alta frecuencia (8 a 10 Hz) en la actividad theta del giro dentado.

Referencias

Altman, H. J., S.O. Ogren, R.F. Berman & H.J. Normile. 1989. The effects of p-chloroanphetamina, a depletory of brain serotonin, on the performance of rats in two types of positively reinforced complex spatial discrimination tasks. Beba. Neural. Biol. 52:131-144.

Asin, K.E., D. Wirtshafter & H.C. Fibiger. 1985. Electrolytic, but not 5,7-dihidroxytryptamina, lesions of the nucleus medianus raphe impair acquisition of radial maze task. Behav Neural Biol. 44: 415-424.

Azmitia, E.C. & M. Segal. 1978. An autoradiographic análisis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. J. Comp.Neurol. 179: 641-668.

Buhot, M.C., S. Martin & L. Segu. 2000. Role of serotonin in memory impairment. Ann Med. 32(3): 210-221.

Gozalez-Burgos, I., M.I Perez Vega, A.R del Angel Meza & A. Feria Velazco. 1998. Effect of Triptophan Restriction on Short-Term Memory. Physiol Behav. 63(2):165-169.

Guevara, MA & M. Hernández-González. 2006. Registro automatizado de señales bioeléctricas cerebrales durante la ejecución sexual. Universidad de Guadalajara. México. Pp. 131.

Gutiérrez-Guzmán BE. 2007. Efecto de la eliminación de serotonina hipocampal sobre la actividad theta subyacente al aprendizaje espacial en ala rata. UMSNH. Morelia Michoacán. México. Pp. 82.

Gutiérrez-Guzmán, BE., I. González-Burgos, M.A. Guevara & M.E. Olvera-Cortés. 2007. Modulación serotoninérgica de la actividad theta hipocampal, en Guevara MA, Hernández-González M, Arteaga-Silva M & Olvera-Cortés ME. Aproximaciones al estudio de la funcionalidad cerebral y el comportamiento. Universidad de Guadalajara. Pp.558.

Kitchigina, V.F., T.A. Kudina, E.V. Kutyreva & O.S. Vinogradova. 1999. Neuronal activity of the septal pacemaker of theta rhythm under the influence of stimulation and blockade of he median raphe nucleus in the awake rabbit. Neuroscience 94: 453-463.

Kudina, T.A., V.V. Sudnitsyn, E.V. Kutyreva & V.F. Kichigina. 2004. The serotonin reuptake inhibitor fluoxetine suppresses theta oscillations in the electroencephalogram of the rabbit hippocampus. Neurosci Behav Physiol. 34(9):929-33.

McKenna, J.T & R.P. Vertes. 2001. Collateral proyections from the median raphe nucleus to the medial septum and hippocampus. Brain Res Bull. 54(6):619-630.

Mietinen, R & T.F Freund. 1992. Convergence and segregation of septal and median raphe inputs onto different subsets of hippocampal inhibitory interneurons. Brain Res. 594 (2): 263-272.

O´Keffe, J. & L. Nadel. 1978. The hippocampus as a cognitive map. Oxford: Claredon Press. Pp.

Olvera-Cortés, M.E., M. Cervantes & I. González-Burgos. 2002. Place-learning, but not cue-learning training, modifies the hippocampal theta rhythm in rats. Brain Res Bull. 58(3): 261–270.

Olvera-Cortés, M.E., M.A. Guevara & I. González-Burgos. 2004. Increase of the hippocampal theta activity in the morris water maze reflects learning rather tham motor activity. Brain Res Bull. 62 (5):379-384.

Paxinos, G. & C.H. Watson.1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. Edit. Academic press. Edic.4ta. San Diego, CA. USA.

Pissadaki, E.K & P. Poirazi. 2007. Modulation of excitability in CA1 pyramidal neurons via the interplay of entorhinal cortex and CA3 inputs. Neurocomputing 70 1735–1740.

Richter-Levin, G., V. Greenberger & M. Segal. 1994. The effects of general and restricted serotoninergic lesions on hipocampal electrophysiology and behavior. Brain Res. 642:111-116.

Segal, M. 1975. Physiological and pharmacological evidence for a serotoninergic projection to the hippocampus. Brain Res. 94: 115-131.

Sutherland, R.J., & A.J. Rodriguez. 1989. The role of the fimbria and some related subcortical structures in place learning and memory. Behav Brain Res 32: 265-77.

Vanderwolf, C.H. 1988. Cerebral activity and behabior: control by central cholinergic and serotoninergic systems. Int. Rev. Neurobiol. 30:255-325.

Vertes, R.P., G.G. Kinney, B. Kocsis & W. Fortin. 1994. Pharmacogical suppression of the median raphe nucleus with serotonin-1A agonist, 8-OH-DPAT and buspirone, produces hippocampal theta rhythm in the rat. Neuroscience 60: 441-451.

Vertes, R.P., W.B. Hoover & G. Viana Di Prisco. 2004. Theta Rhythm of the Hippocampus: Subcortical Control and Functional Significance. Behav Cognitive Neurosci Rev. 3(3): 173-200.

Yamamoto, T., S. Watanabe, R. Oishi & S. Ueki. 1979. Effects of midbrain raphe stimulation and lesion on EEG activity in rats. Brain Res. Bull. 4:491-495.